

doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2019.05.04

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1000-4432.2019.05.04>

四川地区脉络膜黑色素瘤患者GNAQ, GNA11基因突变检测

何继才¹, 杨荣琴¹, 彭睿²

(1. 凉山彝族自治州第一人民医院眼科, 四川 凉山 615000; 2. 四川大学华西医院眼科, 成都 610000)

[摘要] 目的: 检测四川地区脉络膜黑色素瘤患者GNAQ, GNA11基因的突变情况。方法: 对22名脉络膜黑色素瘤患者行眼球剜除术, 眼球组织用甲醛固定, 石蜡包埋保存。从肿瘤石蜡切片中提DNA进行PCR扩增反应, 并对GNAQ, GNA11突变位点进行测序分析。结果: 在16名患者的肿瘤组织中检测到GNAQ或GNA11基因突变, 总突变率为72.73%, 其中GNAQ突变率为45.45%, GNA11突变率为27.28%。结论: GNAQ, GNA11基因在四川地区脉络膜黑色素瘤患者中的突变率较高。

[关键词] 脉络膜黑色素瘤; GNAQ基因; GNA11基因

Genetic analyses of GNAQ and GNA11 mutation in uveal melanoma in Sichuan

HE Jicai¹, YANG Rongqin¹, PENG Rui²

(1. Department of Ophthalmology, No. 1 People's Hospital of Liangshan Yi Autonomous Prefecture, Liangshan Sichuan 615000;
2. Department of Ophthalmology, West China Hospital, Chengdu 610000, China)

Abstract **Objective:** To sequence the GNAQ and GNA11 mutation in patients with uveal melanoma from Sichuan Province. **Methods:** A total of 22 samples were collected from uveal melanoma patients. DNA was extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tissue. Primers of GNAQ and GNA11 were synthesized. Polymerase chain reaction was performed and the products were sent to sequencing. **Results:** A total of 16 cases among the patients with uveal melanoma were found with GNAQ or GNA11 mutation. The overall mutation rate was 72.73%. And the mutation rates for GNAQ and GNA11 were 45.45% and 27.28%, respectively. **Conclusion:** The patients with uveal melanoma in Sichuan province have a high level of GNAQ/GNA11 mutation rate.

Keywords uveal melanoma; GNAQ gene; GNA11 gene

脉络膜黑色素瘤是成年人最常见的眼内恶性肿瘤^[1]。约50%的脉络膜黑色素瘤患者会发生转移, 而目前几乎没有任何有效的治疗方法^[2]。

在发现肿瘤转移后, 患者的生存时间一般少于6个月^[3]。

GNAQ和GNA11基因编码Gαq蛋白, 其参与

收稿日期 (Date of reception): 2019-03-13

通信作者 (Corresponding author): 彭睿, Email: 85882216@qq.com

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (81602597)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81602597).

调节G蛋白偶联受体和下游的效应器^[4]。研究^[4]表明:原癌基因GNAQ和GNA11的突变率在白种人中约为80%。这2个基因的突变会导致丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)激酶通路上调,很可能是脉络膜黑色素瘤发生发展的主要因素^[5]。然而最近在中国人群中的研究^[6]发现:只有约30%的患者有这2个基因的突变。提示基因突变及其在肿瘤发生中的作用可能随人种不同而不同。本研究检测分析了四川地区脉络膜黑色素瘤患者的GNAQ和GNA11基因突变情况,旨在明确这两个基因在该地区患者中的突变率。

1 对象与方法

1.1 对象

收集2011年1月至2016年1月四川大学华西医院以及四川省凉山彝族自治州第一人民医院的22例脉络膜黑色素瘤患者。纳入标准:年龄性别不限,明确的组织病理学诊断,患者自愿参加本研究。排除标准:不符合入选标准者;已经或正在接受脉络膜黑色素瘤放射以及药物治疗的患者。诊断依据包括眼底检查、B超检查以及组织病理检查。临床检查主要包括患者年龄、性别、肿瘤厚度、最大基底直径、组织细胞类型、是否侵犯睫状体、是否侵犯视神经、是否发生转移。随访时间不少于3年。本研究严格遵守赫尔辛基宣言,所有临床与实验室检查均取得患者的知情同意,并经四川大学华西医院医学伦理委员会审核批准。

1.2 DNA 提取及测序

眼球摘除后,常规进行甲醛固定,石蜡包埋。获得石蜡切片后,通过DNA提取试剂盒(QIAamp DNA Mini KIT,德国Qiagen公司)对肿瘤组织进行DNA提取。Primer 5.0软件设计GNAQ和GNA11的4号和5号外显子的引物,引物由上海生工生物公司合成。引物序列:GNAQ exon5上游引物为5'-GACTTGGATGATCATCGTCATT-3',下游引物为5'-AAGAAAGCAAAGAAGTAAGTTCAC-3';GNAQ exon4上游引物为5'-TGTCCTTCCC-TTTCCGTAGA-3',下游引物为5'-TGGGAAATAGG-TTTCATGGACT-3';GNA11 exon 5上游引物为5'-AGCGTCCTTGCCCGTTCTA-3',下游引物为

5'-AGGGCCCCACCTCGTTGTC-3';GNA11 exon 4上游引物为5'-GCTGGTTTGGGTGCTGTGT-3',下游引物为5'-GGCAAATGAGCCTCTCAGTGT-3'。通过PCR反应扩增目标基因,扩增的PCR产物通过ABI PRISM 3.0 Genetic analyzer(ABI,上海生工生物公司)测序。测序结果通过DNASTAR软件分析。

2 结果

2.1 临床结果

本研究对22位脉络膜黑色素瘤患者行眼球摘除术。患者年龄为(42.1±14.8)岁,男女比例为12/10(表1)。患者均为单眼发病。在随访期间,7名患者发现了肿瘤转移,其中5名患者为肝转移,2名患者为多器官转移。这7名患者都因肿瘤转移发生死亡,术后存活时间为(424.1±69.33) d。其余未发生肿瘤转移的患者的随访时间均大于3年。

表1 脉络膜黑色素瘤患者的临床及病理情况

Table 1 Clinicopathological data of uveal melanoma patients

临床病理特征	数值
年龄/岁	42.1 ± 14.8 (24~69)
民族/[例(%)]	
汉族	16 (72.73)
少数民族	6 (27.27)
性别(男/女)/[例(%)]	12 (54.55)/10 (45.46)
最大基底膜直径/mm	16.7 ± 3.3
肿瘤厚度/mm	12.5 ± 4.2
细胞类型/[例(%)]	
梭形细胞	13 (59.1)
类上皮样细胞	1 (4.55)
混合细胞型	8 (36.36)
巩膜侵犯	13 (59.1)
累及睫状体	6 (27.27)
累及视神经	3 (13.64)
转移/[例(%)]	7 (31.82)
诊断到手术的时间/d	146.5 ± 71.2
转移患者术后存活时间/d	424.1 ± 69.33

2.2 基因检测结果

对GNAQ和GNA11基因的4号、5号外显子进行测序。总突变率分别为45.46%，27.28%；其中，

GNAQ基因发生Q209P突变的突变率为31.82%，发生Q209L的突变率为13.63%（表2）。没有患者同时发生GNAQ和GNA11基因突变（图1）。

表2 基因突变分布

Table 2 Proportion of each mutation type

基因	突变位点	n	百分比/%
GNA11 exon 5	c.626A>T (Q209L)	6	27.28
GNA11 exon4	-		
GNAQ exon 5	c.626A>C (Q209P)	7	31.82
	c.626A>T (Q209P)	3	13.64
GNAQ exon 4	-		

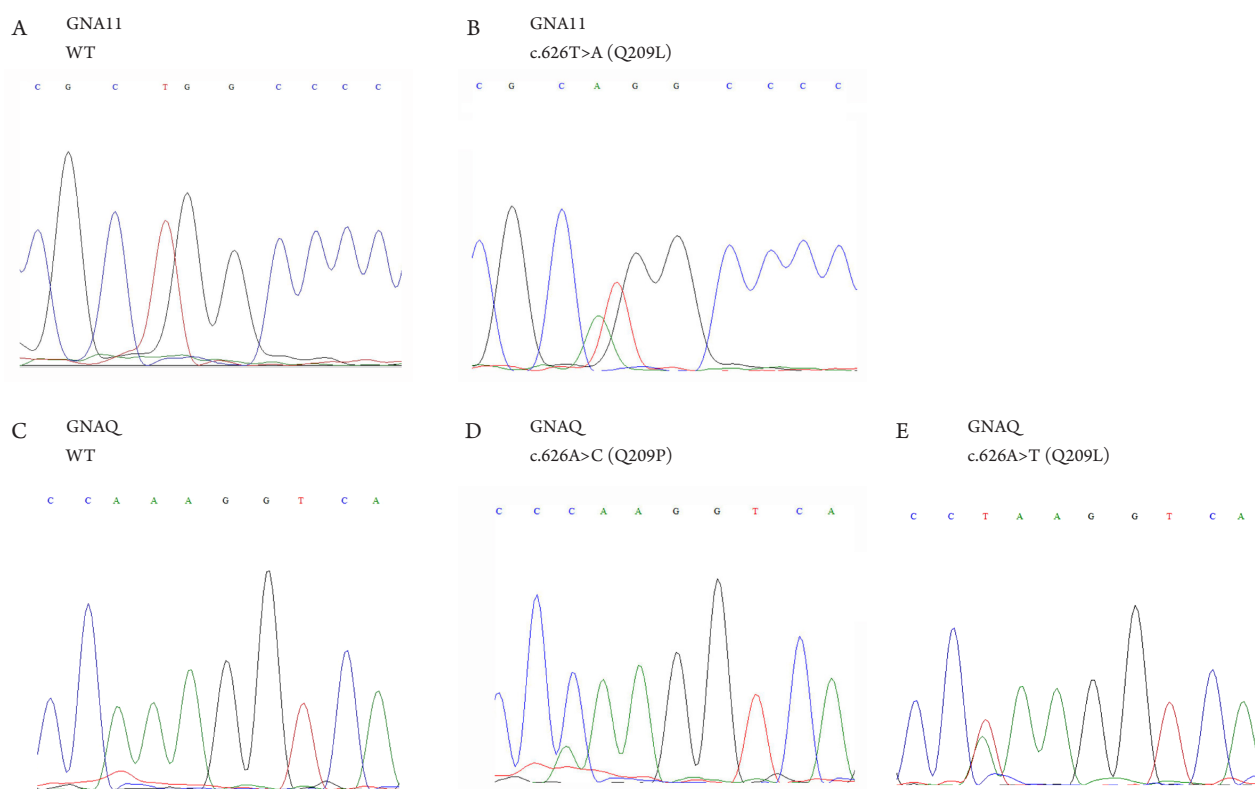


图1 基因突变位点

Figure 1 Mutation sites

(A)GNA11基因野生型序列；(B)GNA11基因点突变，cDNA序列626位点胸腺嘧啶突变为腺嘌呤；(C)GNAQ基因野生型序列；(D)GNAQ基因点突变，cDNA序列626位点腺嘌呤突变为胞嘧啶；(E)GNAQ基因点突变，cDNA序列626位点腺嘌呤突变为胸腺嘧啶。

(A) Wildtype sequence of GNA11 gene; (B) Point mutation of GNA11, c. 626 T>A; (C) Wildtype sequence of GNAQ; (D) Point mutation of GNAQ, c. 626 A>C; (E) Point mutation of GNAQ, c.626 A>T.

3 讨论

在本研究中, 脉络膜黑色素瘤发生GNAQ和GNA11基因突变率分别为45.46%和27.28%, 总突变率为72.74%。Van Raamsdonk等^[4]报道: 在高加索人群中, 83%的脉络膜黑色素瘤中检测到GNAQ或GNA11突变。本研究结果与之相近。然而, Xu等^[6]报道: 在中国脉络膜黑色素瘤患者中, GNAQ或GNA11突变率仅为38%(GNAQ: 18%; GNA11: 20%)。推测其原因如下: 1) 本研究样本量太小, 可能会造成统计误差; 2) 肿瘤组织长期保存中发生DNA降解, 导致测序不准确; 3) 中国北方人和南方人或者少数民族患者之间可能存在基因差异。由于本研究医院所属地区脉络膜黑色素瘤患者较少, 且不易随访, 因此样本确实有限。为减小测序误差, 所有PCR产物都测序2次, 若结果不一致再加测。

脉络膜黑色素瘤的突变负担小于大部分肿瘤, 与儿童肿瘤的突变负担相似^[7]。而GNAQ和GNA11突变一直被认为是在肿瘤早期发生的突变, 并被认为在肿瘤的发生中起重要作用^[8-11]。在Van Raamsdonk等^[4,12]的报道中, 大多数GNAQ和GNA11突变都发生在209密码子, 少数发生在183密码子。在本研究中, GNAQ和GNA11突变都发生在209密码子。另外笔者团队^[6]也未发现4号外显子突变, 这之前关于中国人群的报道相符。

综上, GNAQ和GNA11基因在四川地区脉络膜黑色素瘤患者中的突变率较高。

参考文献

1. Singh AD, Turell ME, Topham AK. Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival[J]. *Ophthalmology*, 2011, 118(9): 1881-1885.
2. Chandran SS, Somerville RPT, Yang JC, et al. Treatment of metastatic uveal melanoma with adoptive transfer of tumour-infiltrating lymphocytes: a single-centre, two-stage, single-arm, phase 2 study[J].

- Lancet Oncol, 2017, 18(6): 792-802.
3. Buder K, Gesierich A, Gelbrich G, et al. Systemic treatment of metastatic uveal melanoma: review of literature and future perspectives[J]. *Cancer Med*, 2013, 2(5): 674-686.
4. Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, et al. Mutations in GNA11 in uveal melanoma[J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(23): 2191-2199.
5. Rothermel LD, Sabesan AC, Stephens DJ, et al. Identification of an immunogenic subset of metastatic uveal melanoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(9): 2237-2249.
6. Xu X, Wei WB, Li B, et al. Oncogenic GNAQ and GNA11 mutations in uveal melanoma in Chinese[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109699.
7. Robertson AG, Shih J, Yau C, et al. Integrative analysis identifies four molecular and clinical subsets in uveal melanoma[J]. *Cancer Cell*, 2017, 32(2): 204-220.
8. Gezgin G, Dogrusöz M, van Essen TH, et al. Genetic evolution of uveal melanoma guides the development of an inflammatory microenvironment[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66(7): 903-912.
9. Corrêa ZM, Augsburger JJ. Independent prognostic significance of gene expression profile class and largest basal diameter of posterior uveal melanomas[J]. *Am J Ophthalmol*, 2016, 162: 20-27.e1.
10. Liang C, Peng L, Zeng S, et al. Investigation of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 expression in uveal melanoma[J]. *Exp Eye Res*, 2019, 181: 112-119.
11. Vader MJC, Madigan MC, Versluis M, et al. GNAQ and GNA11 mutations and downstream YAP activation in choroidal nevi[J]. *Br J Cancer*, 2017, 117(6): 884-887.
12. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, et al. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi[J]. *Nature*, 2009, 457(7229): 599-602.

本文引用: 何继才, 杨荣琴, 彭睿. 地区脉络膜黑色素瘤患者GNAQ、GNA11基因突变检测[J]. 眼科学报, 2019, 34(2): 99-102. doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2019.05.04

Cite this article as: HE Jicai, YANG Rongqin, PENG Rui. Genetic analyses of GNAQ and GNA11 mutation in uveal melanoma in Sichuan[J]. *Yan Ke Xue Bao*, 2019, 34(2): 99-102. doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2019.05.04